

Column for the magnetic separation of cells, cell aggregates and cellular constituents**Publication number:** DE3720844**Publication date:** 1989-01-05**Inventor:** MILTENYI STEFAN (DE); RADBRUCH ANDREAS DR (DE); WEICHEL WALTER (DE); MUELLER WERNER DR (DE); GOETTLINGER CHRISTOPH (DE); MEYER KLAUS LUDWIG (DE)**Applicant:** MILTENYI STEFAN (DE); RADBRUCH ANDREAS DR (DE); WEICHEL WALTER (DE); MUELLER WERNER (DE); GOETTLINGER CHRISTOPH (DE); MEYER KLAUS LUDWIG (DE)**Classification:****- international:** *B01D15/00; B01D43/00; B01J20/28; B03C1/034; C12M1/26; C12M3/00; C12N5/02; G01N33/50; G01N33/543; B01D15/00; B01D43/00; B01J20/28; B03C1/02; C12M1/26; C12M3/00; C12N5/02; G01N33/50; G01N33/543; (IPC1-7): C12M1/00; B01D57/00; B63C5/00; C12M3/00; C12N5/00; G01N33/48***- European:** B01D15/00; B01D43/00; B01J20/28; B03C1/034; C12M1/26G; C12M3/00; G01N33/50D; G01N33/543D4**Application number:** DE19873720844 19870624**Priority number(s):** DE19873720844 19870624[Report a data error here](#)**Abstract of DE3720844**

The invention relates to a novel column for the separation of magnetically labelled cells, cell aggregates or cellular constituents in aqueous suspension. For the fractionation, the column is exposed to an external magnetic field while the suspension runs through. Unlabelled elements pass through the column, while labelled elements remain suspended in the matrix. They can be eluted after removal of the magnetic field. The plastic coating on the inner wall of the column results in medium and cell or cell constituents being separated from the ferromagnetic matrix, which protects the constituents to be separated from damage. The coating stabilises the ferromagnetic matrix, and non-magnetic trapping sites are filled with plastic. Hitherto unattainable speeds and quality of separation can be achieved therewith at low expense.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3720844 A1**

⑳ Aktenzeichen: P 37 20 844.6
㉑ Anmeldetag: 24. 6. 87
㉒ Offenlegungstag: 5. 1. 89

⑤① Int. Cl. 4:
C12M 1/00
C 12 N 5/00
C 12 M 3/00
B 01 D 57/00
G 01 N 33/48
B 63 C 5/00

DE 3720844 A1

㉑ Anmelder:

Miltényi, Stefan, 5060 Bergisch Gladbach, DE;
Radbruch, Andreas, Dr., 5300 Bonn, DE; Weichel,
Walter; Müller, Werner, Dr.; Göttlinger, Christoph,
5000 Köln, DE; Meyer, Klaus Ludwig, 5024 Pulheim,
DE

㉒ Erfinder:

gleich Anmelder

⑤② Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DE-PS 7 34 137
DE 26 16 734 A1
US 37 00 555
WO 84 01 503 A1

GB-Z: SETCHELL, C.H., Magnetic Separations in
Biotechnology - a Review. In: J.Chem. Tech.
Biotechnol., 1985, 35 B, S.175 - 182;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Trennsäule für die magnetische Separierung von Zellen, Zellaggregaten, und zellulären Bestandteilen

Die Erfindung betrifft eine neuartige Trennsäule zur Separierung von magnetisch markierten Zellen, Zellaggregaten oder zellulären Bestandteilen in wäßriger Suspension. Zur Auftrennung wird die Säule einem externen Magnetfeld ausgesetzt und mit der Suspension durchspült. Unmarkierte Elemente gelangen durch die Säule hindurch, markierte bleiben in der Matrix hängen. Nach Entfernen des Magnetfeldes können sie eluiert werden. Durch die inwändige Beschichtung der Säule mit Kunststoff werden Medium und Zellen bzw. Zellbestandteile von der ferromagnetischen Matrix getrennt, wodurch die zu trennenden Bestandteile vor Beschädigung bewahrt werden. Die Beschichtung stabilisiert die ferromagnetische Matrix, unmagnetische Fangstellen sind mit Kunststoff ausgefüllt. Bisher unerreichbare Trenngeschwindigkeiten und Trennqualitäten können mit ihr bei geringem Aufwand erzielt werden.

DE 3720844 A1

Patentansprüche

1. Trennsäule für die magnetische Separierung von Zellen, Zellaggregaten und zellulären Bestandteilen, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Säuleninnere feine ferromagnetische Strukturen enthält, die mit einem Kunststoff überzogen sind, wobei manche Bereiche des Säuleninneren ebenfalls mit dem Kunststoff ausgefüllt sind.
2. Trennsäulen nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei den ferromagnetischen Strukturen um Stahlwolle handelt.
3. Trennsäule nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei den ferromagnetischen Strukturen um nichtrostende Stahlwolle handelt.
4. Trennsäule nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei den ferromagnetischen Strukturen um Drähte handelt.
5. Trennsäule nach Anspruch 1-4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die ferromagnetischen Fasern im Wesentlichen in Durchflußrichtung verlaufen.
6. Trennsäule nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei den ferromagnetischen Strukturen um Kugelschüttungen aus ferromagnetischem Material handelt.
7. Trennsäule nach Anspruch 1-6, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Kunststoff bei der Herstellung der Säule nach dem Packen der ferromagnetischen Strukturen zur Säule eingebracht wird.
8. Trennsäule nach Anspruch 1-7, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Kunststoff bei der Herstellung der Säule in einer flüssigen oder suspendierten Form in die Säule eingebracht wird.
9. Trennsäule nach Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß überschüssiger Kunststoff durch Einwirken von Kräften noch im flüssigen oder suspendierten Zustand aus der Säule entfernt wird.
10. Trennsäule nach Anspruch 1-8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Beschichtung bei der Herstellung in Gegenwart von magnetisierbaren Flüssigkeiten und magnetischen Feldern erfolgen kann.
11. Trennsäule nach Anspruch 1-10, **dadurch gekennzeichnet**, daß das ferromagnetische Material vor der Beschichtung, zur Verbesserung seiner magnetischen Eigenschaften oder zur Verbesserung der Haftung und Benetzung mit dem Kunststoff geeignet, vorbehandelt wird.
12. Trennsäule nach Anspruch 1-11, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kunstoffschicht mit weiteren Stoffen behandelt oder überzogen ist.
13. Trennsäule nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich bei der Behandlung um eine Silikonisierung handelt.

Beschreibung

Trennsäule für die magnetische Separierung von Zellen, Zellaggregaten und zellulären Bestandteilen Die erfindungsgemäße Trennsäule dient der Fraktionierung von magnetisch markierten Gemischen aus Zellen, Zellaggregaten oder Zellbestandteilen.

Zellen und deren Bestandteile haben von Natur aus bis auf wenige Ausnahmen keine besonderen magnetischen Eigenschaften.

Durch die gezielte Ankopplung von magnetischen Strukturen (superparamagnetischen Mikropartikeln, Ferritin, Erythrozyten mit desoxygeniertem oder reduziertem Hämoglobin, oder sonstigen Magnetpartikeln)

an bestimmte Zellen, Zellaggregate oder Zellbestandteile, können diese magnetisch markiert werden. Die Ankopplung kann sehr spezifisch über Antikörper oder über andere, an bestimmte Strukturen bindende Substanzen erfolgen.

Eine Auftrennung erfolgt in einem inhomogenen Magnetfeld. Das Gemisch wird in zwei Fraktionen aufgeteilt, eine, deren Elemente magnetische Strukturen gebunden haben, somit selbst magnetisierbar geworden sind, und eine unmagnetische. Die magnetische (positive) Fraktion ist oft von besonderem Interesse.

Bisherige Verfahren verwenden meist nur Permanentmagnete zur Auftrennung, die an die Wandung des Gefäßes, das die zu trennende Suspension enthält, gehalten werden. Nur wenige nutzen die wesentlich stärkeren Magnetkräfte einer Hochgradientenanordnung HGM. Bei dem besonders aus der Erzaufbereitung bekannten HGM-Verfahren erzeugen feine ferromagnetische Strukturen, wie etwa Metalldrähte, in ihrer Umgebung sehr große Magnetfeldgradienten. Sie sind in großer Menge in eine Säule gepackt. Beim Anlegen eines äußeren Magnetfeldes funktioniert die Säule wie ein Filter. Magnetisierbare Partikel werden von den Drähten angezogen und zurückgehalten.

HGM-Anordnungen haben viele Vorzüge, im Vergleich zu anderen Verfahren:

- Starke Kräfte auf Partikel, auch schon mit kleinen Magneten
- In kleinen Volumina große Abscheideflächen
- keine prinzipiellen Mengenbegrenzungen, da Filter sehr groß gebaut werden können
- schnellere und bessere Trennungen als bei anderen Verfahren

Besonders die Kombination eines HGM Systemes mit superparamagnetischen Markierungspartikeln kann sehr effektiv funktionieren, da diese Partikel im Vergleich zu nur paramagnetischen Stoffen (Ferritin, modifizierte Erythrozyten) schon bei kleinen Feldern sehr stark angezogen werden.

Allerdings führt der unmittelbare Kontakt und die großen wirkenden Kräfte zwischen den Bestandteilen der magnetischen Fraktion und der Drahtoberfläche in bisher bekannten Trennsäulen zu Schädigungen der Zellmembranen oder der Zellbestandteile. Besonders Säugerzellen und Zellorganellen sind sehr empfindlich. Die Verletzungen bzw. die großen Zellverluste begrenzen bisher die Anwendbarkeit dieses Verfahrens auf paramagnetisch markierte Stoffe. Aber auch dort können bisher nur beständige, ferromagnetische Materialien mit sehr glatter Oberfläche verwendet werden. Aber gerade die Edelstähle, die sich durch ihre magnetischen Eigenschaften zur HGM-Trennung eignen, korrodieren in chloridhaltigen Trennmedien. Die nach kurzer Zeit entstehende Rauheit führt zu einer verstärkten Schädigung. Andererseits bieten gerade raue Fasern viele besonders starke magnetische Anheftungspunkte, korrosionsempfindliche oder toxische Materialien bessere magnetische Eigenschaften.

HGM-Anordnungen zur Zelltrennung verwenden bisher nur Trennsäulen, die unbehandelte oder silikonisierte Edelstahldrähte enthalten. Deshalb und durch die nur schwachen paramagnetischen Kräfte sind sie nicht effektiv nutzbar.

Kunststoffbeschichtete Säulen werden bisher nicht eingesetzt.

Durch die Beschichtung bzw. den Verguß der ferro-

magnetischen Matrix werden die oben beschriebenen Probleme beseitigt. Es kann ein zellfreundlicher Kunststoff mit glatter Oberfläche verwendet werden. Der Überzug führt zu einer Abtrennung des Mediums und der Zellen bzw. der Zellbestandteile von der magnetischen Matrix. 5

Die ferromagnetische Struktur wird durch den Verzug mechanisch stabilisiert, nichtmagnetische Fangstellen (enge Spalten etc.) werden verschlossen.

Besonders in Kombination mit superparamagnetischen Markierungspartikeln ermöglicht die erfindungsgemäße Trennsäule außerordentlich gute Trennergebnisse bei sehr geringer Zellschädigung. 10

Herstellungsbeispiel 15

Eine 2 ml Insulinspritze (Durchmesser 6.5 mm) wird auf eine Länge von 20 mm mit 150 mg Cr-Mo Stahlwolle (Werkstoff 1.4113 S, Faserdurchmesser 60 µm) gefüllt. Die Hauptfaserrichtung fällt mit der Achse der Spritze zusammen. Die Stahlwolle wird zunächst benetzt, indem man Lackverdünner (Lesonal V83) durch die Fasern aufzieht. Man läßt den Verdünner ablaufen und zieht anschließend mehrmals angerührten 2-Komponenten Klarlack (Lesonal K 86) durch die Wolle. Nach Abtropfen des überschüssigen Lacks zentrifugiert man die Spritze dann bei 100 g für 1 Minute. 20 25

Nach 2 Tagen ist der Lack getrocknet. Im Wasserstrahlvakuum wird die innere Kunststoffoberfläche nun silikonisiert. Die nun fertige Trennsäule hat eine Kapazität von 20 cm², ausreichend für ca. 10⁷ Zellen (z.B. Lymphozyten). Sie kann autoklaviert und wiederverwertet werden. 30

Literatur 35

- Whitesides, G. M., Kazlauskas, R. J., Josephson, L.:
Magnetic separations in biotechnology.
Trends in Biotechnology Vol. 1, No. 5, 144–148,
(1983). 40
- Kemshead, J. T., Ugelstad, J.:
Magnetic separation techniques: their application to
medicine. Molecular and Cellular Biochemistry 67,
11–18 (1985). 45

45

50

55

60

65

- Leerseite -